



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 100 46 508 A 1

51 Int. Cl. 7:
A 61 K 38/17
A 61 K 31/711
A 61 K 9/51

21 Aktenzeichen: 100 46 508.0
22 Anmeldetag: 14. 9. 2000
43 Offenlegungstag: 5. 4. 2001

DE 100 46 508 A 1

68 Innere Priorität:
199 44 971. 6 14. 09. 1999

71 Anmelder:
Tridelta BIO Medical GmbH, 07330 Unterloquitz, DE

74 Vertreter:
Patentanwälte Gulde Hengelhaupt Ziebig, 10117
Berlin

72 Erfinder:
Bahr, Michael K., 99425 Weimar, DE; Berkov,
Dimitri, Dr., 07747 Jena, DE; Buske, Norbert,
Dr.rer.nat., 12437 Berlin, DE; Clement, Joachim, Dr.,
07749 Jena, DE; Görnert, Peter, Prof. Dr., 07747
Jena, DE; Höffken, Klaus, Prof. Dr., 99425 Weimar,
DE; Kliche, Kay-Oliver, Dr., 07751 Zöllnitz, DE;
Kober, Thomas, Dipl.-Ing., 10713 Berlin, DE;
Schnabelrauch, Matthias, Dr., 07745 Jena, DE; Vogt,
Sebastian, Dr., 07749 Jena, DE; Wagner, Kerstin,
Dr., 07745 Jena, DE; Gansau, Christian, Dr., 16761
Hennigsdorf, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Magnetische Nanoteilchen mit biochemischer Wirksamkeit und Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung

57 Die Erfindung bezieht sich auf magnetische Nanoteilchen, ihre Herstellung sowie auf ihre Verwendung. Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Nanoteilchen, die spezifisch auch im intrazellulären Bereich von Zellen Bindungen an intrazelluläre Biomakromoleküle eingehen können, so daß durch Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes eine Separation möglich wird. Die Lösung erfolgt durch magnetische Nanoteilchen mit biochemischer Wirksamkeit, bestehend aus einem magnetischen Kernteilchen und einer am Kernteilchen fixierten Hüllschicht, enthaltend eine Verbindung der allgemeinen Formel M - S - L - Z (I), wobei die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und L und Z kovalent gebundene funktionelle Gruppen aufweisen und wobei M das magnetische Kernteilchen, S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat, L eine Linker-Gruppierung ist und Z eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, ist.

DE 100 46 508 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf magnetische Nanoteilchen, ihre Herstellung sowie auf ihre Verwendung gemäß den Oberbegriffen der Ansprüche 1, 9, 13, 17, 18, 19, 21 und 23 bis 25.

- 5 Krebskrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen. Immer mehr Menschen sterben insbesondere an Lungen-, Brust- und Prostatakrebs. Die Bekämpfung von Krebskrankungen gehört darum gegenwärtig zu den vorrangigen Zielen der Medizin.

- Zu den üblichen Behandlungsmethoden der Bekämpfung von metastasierenden Tumoren gehört neben der operativen Entfernung befallener Organe die Chemotherapie mit ihrem bekannten Nebenwirkungsprofil, da die Medikamente in-
10 folge ihrer unspezifischen Wirkung auch gesunde Zellen schädigen und zwar an den dafür empfänglichen Stellen des gesamten Körpers.

Neue Therapieansätze nutzen u. a. Immunreaktionen, indem einmal die körpereigenen Abwehrkräfte durch Botenstoffe oder Zytokine aktiviert werden und zum anderen Eiweißmoleküle und/oder monoklonale Antikörper die Tumorzellen vernichten.

- 15 Neuentwicklungen auf dem Gebiet der Tumorzellseparation benutzen bereits Teilchen mit magnetischem Kern, die mit biologisch aktiven Hüllsubstanzen modifiziert sind. Sogenanntes "drug targeting" mit an magnetische Mikrosphären gekoppelten Substanzen wie Doxorubicin oder anderen Zytostatika befinden sich in der Entwicklung.

- Die auch bekannten "Microbeads" und "Dynabeads" werden schon für diagnostische Verfahren genutzt, indem die magnetischen Mikrosphären infolge biologischer Wechselwirkung an die Zellmembran maligner Zellen adsorbiert und anschließend magnetisch separiert werden. Da die Oberflächenstruktur der Zellmembran im allgemeinen unspezifisch ist,
20 liegen die Separationsraten allerdings bei weniger als 80%. Das hat zur Folge, daß die Gefahr besteht, daß viele Krebszellen nicht separiert worden sind. Diese können weiterhin Metastasen bilden.

- Die Separation zum Zwecke der Diagnose erfolgt dabei ausschließlich extrakorporal, d. h. die Flüssigkeit mit den zu separierenden Zellen wird in einem geeigneten Gefäß außerhalb des menschlichen Körpers behandelt. Nach der Separation
25 kann die nun gereinigte Flüssigkeit wieder dem menschlichen Körper zugeführt werden.

Aufgrund der unvollständigen Abtrennung der malignen Zellen ist zu erwarten, daß dieses Verfahren nach einiger Zeit wiederholt werden muß. Da aber das Verfahren ohnehin kranke Personen sehr stark belastet, ist eine wiederholte Behandlung nur sehr begrenzt möglich.

- In der DE 41 16 093 A1 ist ein Verfahren zur Gewinnung magnetischer Träger durch kontrollierte Modifizierung der Oberfläche von magnetischen Teilchen beschrieben. Nach diesem Verfahren werden magnetische Teilchen beschrieben,
30 die auch magnetische Flüssigkeiten zu bilden in der Lage sind, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie Heteropolyanionen und gesättigte oder ungesättigte oberflächenaktive Mittel tragen. Diese Oberflächenmodifizierung soll ermöglichen, daß biologisch aktive Moleküle, unter anderem Antikörper, an die Oberfläche der Teilchen gebunden werden können. Die biologisch aktiven Moleküle werden hier über Thio-Brücken an Polythiole gebunden. Unter anderem werden
35 hier als Linker-Substanzen Dicarbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren sowie Dimerkaptobersteinsäure eingesetzt. Diese Verbindungen sind in der Lage, aufgrund einer Eisen-komplexierenden Gruppe an das magnetische Teilchen zu binden.

Es hat sich gezeigt, daß diese magnetischen Teilchen, die auf der Oberfläche biologisch aktive Moleküle enthalten, nicht geeignet sind, in intrazelluläre Räume einzudringen und dort mit Biomakromolekülen zu koppeln, da sie keine ausreichende Biokompatibilität besitzen.

- 40 In der DE 196 24 426 A1 sind magnetische Flüssigkeiten für den Transport von diagnostisch oder therapeutisch wirksamen Substanzen beschrieben. Die magnetischen Kernteilchen werden mit Polymeren umhüllt, die reaktive Gruppen aufweisen, die zur kovalenten Bindung oder zum Ionenaustausch befähigt sind. An diese durchaus biokompatible Hülle, die unter anderem aus Dextran bestehen kann, können neue oder zusätzliche funktionelle Gruppen aufgebracht oder aktiviert werden, z. B. Bersteinsäureanhydrid oder Chloressigsäure, an die dann die diagnostisch oder therapeutisch wirksamen Substanzen entweder über eine heteropolare oder eine kovalente Bindung fixiert werden. Das an das Magnetteilchen auf die beschriebene Weise gebundene Pharmakon soll intravenös verabreichbar sein und mittels eines magnetischen Hochgradientenfeldes im Bereich eines Zielgebietes wie z. B. eines Tumores oder einer entzündlichen Gewebsregion fixiert werden und dort seine diagnostischen und therapeutischen Wirkungen entfalten. Um diesen Transport im Magnetfeld zu ermöglichen, ist hier eine hohe intravasale Verfügbarkeit der Magnetteilchen erforderlich, deren Partikelgröße mit 200–500 nm angegeben werden. Schon aufgrund der Größe der Teilchen ist auch hier ein Eindringen der Teilchen in intrazelluläre Räume nicht möglich. Auch eine spezifische Bindung an intrazelluläre Biomakromoleküle ist mit diesen Teilchen nicht durchführbar.

- Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Nanoteilchen, die spezifisch auch im intrazellulären Bereich von Zellen Bindungen an intrazelluläre Biomakromoleküle eingehen können, so daß durch Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes eine Separation möglich wird.

- 55 Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß mit den kennzeichnenden Teilen der Ansprüche 1, 9, 13, 17, 18, 19, 21 und 23 bis 25.

Die erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen sind vorteilhafterweise in der Lage durch die Zellmembranen in intrazelluläre Räume einzudringen und dort mit intrazellulären Biomakromolekülen zu interagieren.

- 60 Die magnetischen Nanoteilchen bestehen aus fer- oder ferromagnetischem Material und weisen biologisch aktive und/oder therapeutisch wirksame Hüllschichten auf. Sie sind in der Lage, zum einen die Zellmembran der Zellen zu durchdringen und zum anderen in den intrazellulären Bereich von malignen Zellen mit hoher Spezifität an dem dort befindlichen Targets anzudocken.

- Die Größe der erfindungsgemäßen Nanoteilchen beträgt in der Regel 2 bis 100 nm. Die Nanoteilchen haben hinsichtlich des Vermögens der Durchdringung der Zellmembran und ihrer besseren Körperverträglichkeit hervorragende Eigenschaften. Obwohl sie wegen des kleinen Volumens ein relativ geringes magnetisches Moment besitzen, führt die intrazelluläre Teilchenagglomeration aufgrund der Bindung an die intrazellulären Zielbiomakromoleküle zu einer Konzentrationssteigerung mit Erhöhung des magnetischen Momentes der abzutrennenden malignen Zellen, was die magnetische

Separation begünstigt.

Typische Kernmaterialien der erfindungsgemäßen Nanoteilchen sind Ferrite der allgemeinen Zusammensetzung $\text{Me}_x\text{Fe}_{2-x}\text{O}_3$, wobei Me ein zweiwertiges Metall, wie Co, Mn oder Fe ist. Weitere geeignete Materialien sind $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Reinelemente Co, Fe, Ni und Metallverbindungen, wie Carbide und Nitride.

Da das magnetische Moment von Cobalt und Eisen bis zu vierfach höher als das der Ferrite ist, sind diese Stoffe bei gleicher Teilchengröße und gleichen Magnetfeldern effektiver abzutrennen. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß die biologische Verträglichkeit dieser Materialien geringer ist. Das kann ein Vorteil sein, wenn dadurch eine zusätzliche Schädigung von beispielsweise malignen Zellen erfolgt. Andererseits ist die Expositionszeit und Konzentration dieser Stoffe in gesunden Zellen zu begrenzen.

Das Zusammenspiel von biochemischen, medizinischen und physikalischen Eigenschaften erfordert die Herstellung von maßgeschneiderten magnetischen Kernmaterialien und Hüllschichten.

Erfindungsgemäß ermöglichen die magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1 ein Durchdringen der Zellmembranen und das Interagieren der magnetischen Nanoteilchen mit intrazellulären Zielbiomakromolekülen. Dazu ist es erforderlich, die magnetischen Nanoteilchen homogen in Körperflüssigkeiten zu verteilen, denn aggregierte Nanoteilchen sind nicht in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen. Das setzt unter anderem eine genügend dicke Hüllschicht, die wenigstens in der Größenordnung des Radius der Kerne sein muß, und eine gute Biokompatibilität der Bestandteile der Hüllschicht voraus. Ladungsträger im Hüllmaterial, also ein höheres Zetapotential, können die Dispergierfähigkeit in der Körperflüssigkeit zusätzlich günstig beeinflussen.

Eine besonders günstige Applikationsform der magnetischen Nanoteilchen ist eine Dispersion gemäß Anspruch 9.

Eine homogene Verteilung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen kann durch Einstellung einer geringen Konzentration der Nanoteilchen-Dispersionen begünstigt werden. Höhere Konzentrationen entstehen dann allerdings im Innenraum der Zelle, wenn die Nanoteilchen durch spezifische Adsorption an Zielbiomakromoleküle im intrazellulären Bereich von Zellen konzentriert werden. Im Inneren der Zelle ist eine Teilchenagglomeration von Vorteil. Die Konzentrationssteigerung an magnetischen Nanoteilchen erhöht das magnetische Moment in der zu separierenden Zelle.

Die Bildung der magnetischen Kernteilchen findet entweder in der wäßrigen oder organischen Phase über Keimbildungs-/Kristallwachstumsprozesse statt. Die Herstellung in der wäßrigen Phase über chemische Fällungsmethoden hat mehrere Vorteile, zum einen bilden sich in einer ersten Stufe die unmodifizierten magnetischen Teilchen, diese können über pH-Einstellungen sowohl positive als auch negative Ladungsvorzeichen erhalten. Erst in einer zweiten Stufe werden die Hüllmoleküle adsorbiert. Die Adsorptionseffektivität richtet sich nach dem Ladungsvorzeichen an der Oberfläche der magnetischen Kernteilchen. Es gilt die Regel, daß Hüllmoleküle mit negativ geladenen Molekülteilchen bevorzugt an Kernoberflächen mit positivem Ladungsvorzeichen adsorbieren. Dabei erfolgt meist eine ionische chemische Reaktion, wie z. B. zwischen Carboxylverbindungen und Aminoverbindungen. Diese hat den Vorteil, daß die adsorbierten Hüllmoleküle einmal vollständig die Kernoberfläche bedecken und zum anderen fest auf dieser verankert sind.

Oft reicht eine koordinative Bindung des biokompatiblen Substrates S für eine feste Verankerung aus, wie das für Polysaccharide bekannt ist.

Die Herstellung von ferromagnetischen Metallkernteilchen erfolgt überwiegend durch Thermolyse der Metallcarbonyle in der organischen Phase. Dabei werden in der organischen Phase lösliche Tenside oder Polymere zugesetzt, die zur Stabilisierung dienen. In der ersten Reaktionsstufe werden dadurch Kernteilchen, die in der organischen Phase homogen verteilt sind, gebildet. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Überführung der Kernteilchen in eine wäßrige Trägerflüssigkeit. Enthält die Hüllschicht modifizierte Aminosäuren, so erfolgt die Überführung der Kernteilchen nach weitgehender Entfernung des organischen Lösungsmittels durch Zusatz von alkalischer wäßriger Trägerflüssigkeit. Die Hüllschicht wird in das wasserlösliche Salz der Aminosäure überführt, die die Dispergierung der magnetischen Kernteilchen bewirkt. Anschließend können über weitere Reaktionen die magnetischen Nanoteilchen hergestellt werden.

Erfindungsgemäß enthalten die magnetischen Nanoteilchen eine Verbindung der allgemeinen Formel M-S-L-Z (I), wobei die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und L und Z kovalent gebundene funktionelle Gruppen aufweisen und wobei

M das magnetische Kernteilchen,

S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat,

L eine Linker-Gruppierung ist und

Z eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, ist.

Die magnetischen Kernteilchen bestehen aus Magnetit, Maghemit, Ferriten der allgemeinen Formel $\text{MeO}_x\text{Fe}_{2-x}\text{O}_3$, wobei Me ein zweiwertiges Metall, wie Cobalt, Mangan, Eisen ist, oder aus Cobalt, Eisen, Nickel, Eisencarbid oder Eisen-nitrid. Die Größe der Kernteilchen beträgt in einer Weiterbildung der Erfindung 2–100 nm.

Das Substrat S wird in einer Ausführung der Erfindung durch die Verbindungen wie Poly- bzw. Oligosaccharide oder deren Derivate wie Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Stärke, Dialdehyd-Stärke, Chitin, Alginate, Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose, Proteine oder deren Derivate wie Albumine, Peptide, synthetische Polymere wie Polyethylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin, Polymethacrylate, bifunktionelle Carbonsäuren und deren Derivate wie die Mercaptobernsteinsäure oder Hydroxycarbonsäuren gebildet.

In einer weiteren Ausführung der Erfindung wird die Linker-Gruppierung L durch Umsetzung einer Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, gebildet.

In einer weiteren Ausführungsvariante der Erfindung sind beispielhaft die funktionellen Gruppen vorgesehen, die als Verknüpfungsgruppierungen für das Substrat S, für die Linker-Gruppierung L und die Gruppierung Z erfindungsgemäß eingesetzt werden können. Wesentlich ist, daß die Verbindung (I) durch kovalente Bindungen gekennzeichnet ist.

Die biochemisch wirksame Verbindung der allgemeinen Formel S-L-Z (II) eignet sich hervorragend zur Herstellung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen.

Die Herstellung der magnetischen Nanoteilchen erfolgt stufenweise. Die magnetischen Kernteilchen werden auf an sich bekannte Weise hergestellt und in einer bevorzugten Variante unmittelbar mit der biochemisch wirksamen Verbindung (II) umgesetzt.

In einer weiteren Ausführung der Erfindung werden die erfindungsgemäßen magnetischen Kernteilchen nach folgendem Verfahren hergestellt:

- a. Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise.
- b. Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit dem biokompatiblen Substrat S und
- c. Umsetzen der entstandenen Verbindung M-S mit einer Verbindung L-Z,

wobei zur Herstellung von L-Z eine Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, umgesetzt werden.

Zur Herstellung der biochemisch wirksamen Verbindung (II) wird so verfahren, daß erst die Verbindung L-Z hergestellt wird und anschließend L-Z mit dem Substrat S umgesetzt wird.

Die erfindungsgemäßen Nanoteilchen lassen sich zur Separation von Zellen, zur Separation von malignen Zellen und zur Separation von intrazellulären Biomakromolekülen verwenden. Als Angriffspunkte für eine Interaktion mit intrazellulären Biomakromolekülen sollen insbesondere auch die Fusionsregionen von Chromosomen als molekulare Marker dienen. Das können z. B. erkrankungstypische molekulare Marker sein. Weiterhin können diese Fusionsregionen zu Fusionsgenen führen, die Fusions-Boten-Ribonukleinsäuren (Fusions-mRNA) und Fusionsproteine hervorbringen. Beispielgebend soll die Chronisch-Myeloische Leukämie (CML) genannt werden. Bei der CML tritt ein Chromosomenrearrangement t(9; 22)(q34; q11) auf, das sog. Philadelphia-Chromosom, das zum BCR/ABL-Genprodukt führt. Das heißt, in den Zellen mit dieser Chromosomenveränderung liegt ein Gen vor, das in keiner anderen Körperzelle vorkommt. Dieses Gen wird in Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben und führt zur Synthese des BCR/ABL-Proteins. Die BCR/ABL-mRNA und das BCR/ABL-Protein kommen nur in den Tumorzellen vor. Als Bindungsdomäne für die magnetischen Nanoteilchen kommt die BCR/ABL-mRNA in Betracht. Die Z-Gruppierung der erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen soll mittels Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkung mit der komplementären Sequenz auf der mRNA interagieren, wobei die BCR/ABL-Fusionstelle in dieser Sequenz enthalten sein muß. Die individualspezifische Sequenz um die Fusionsstelle ist vorher durch Labormethoden bestimmt worden. Die Interaktion soll im Zytoplasma der Tumorzellen stattfinden. Nach dem Andocken der magnetischen Nanoteilchen über die Z-Gruppierung an die komplementäre Sequenz auf der BCR/ABL-mRNA ist die Tumorzelle markiert.

Weitere beispielhafte Krebserkrankungen sind nachfolgend genannt:

40	Hämatologische Erkrankung	Chromosomenrearrangement (Fusionsgenprodukt)
	Akute Lymphatische Leukämie (ALL)	t(9; 22)(q34; q11)(BCR/ABL) t(1; 19)(q23; p13)(E2A/PBX) t(8; 14)(q24; q32) t(2; 8)(p11; q24) t(8; 22)(q24; q11)(MYC, IGH, IGK, IGL) t(4; 11)(q21; q23)(MLL/AF2) t(1; 14)(p32; q11)del(1p32) (TAL1, TCRA)
45	Akute Myeloische Leukämie (AML)	t(8; 21)(q22; q22)(AML/ETO) t(15; 17)(q21; q11)(PML/RARA) inv16(p13q22) t(16; 16)(p13; q22) (MYH11/CBFb) t(6; 9)(p23; q34) (DEK/CAN)
	Non-Hodgkin Lymphome	t(14; 18)(q32; q21)(BCL2/IGH) t(8; 14)(q24; q32) t(2; 8)(p11; q24) t(8; 22)(q24; q11) (MYC, IGH, IGK, IGL) t(11; 14)(q13; q32)(BCL1/IGH) t(3; 14)(q27; q32)(BCL6/IGH)
50	Ewing Sarkom	t(11; 22)(q24; q12)(FLI1/EWS)

Für diese Erkrankungen, die wiederum nur eine Auswahl der denkbaren zu therapierenden Krankheiten darstellen, kommt sinngemäß o. g. Vorgehen zur Anwendung. Es existiert jeweils eine krankheitstypische Basensequenz, die durch die folgenden Chromosomenlokalisationen eindeutig beschrieben ist. Entsprechend soll auch bei diesen Erkrankungen die Z-Gruppierung der magnetischen Nanoteilchen mittels Nukleinsäure-Nukleinsäure-Wechselwirkung mit der komplementären Sequenz (Bindungsdomäne) auf der mRNA interagieren. Die Menge aller exakten Basensequenzen für wiederum alle denkbaren Erkrankungen ist unendlich groß, allein für die CML sind derzeit mehr als 10 Bruchregionen beschrieben, hierzu werden ständig neue beschrieben.

Die Erfindung weist verschiedene Vorteile auf. Zunächst hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen in entsprechenden Zellkultur-Untersuchungen eine hohe Bioverträglichkeit aufweisen. Hierdurch ist eine gefahrlose Applikation möglich, wobei ebenso eine rein extrakorporale Verwendung der Partikel im Rahmen der erfindungsgemäßen Anwendungen denkbar ist. Im Unterschied zu den existierenden Separationsverfahren mittels Durchflußzytometrie (FACS) sowie Magnetseparation (MACS) bieten die erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen entscheidende Vorteile. Mit ihnen ist es möglich, in das Innere der Zellen, das sogenannte Zytoplasma, vorzudringen und hier spezifisch eine Bindung von Biomakromolekülen mit entsprechenden Strukturen wie Bindungsdomänen von Nukleinsäuren herbeizuführen. Auch nach entsprechender Translation entstehende Proteine sind als Zielbiomakromoleküle für

die spezifische Bindung an die Gruppierung Z der allgemeinen Formel (I) ins Auge gefasst. Nach heutigem Kenntnisstand weisen alle bösartigen Erkrankungen ein verändertes Genom in der Zelle als Grundlage auf. Bei einer Reihe von Krankheiten ist diese molekulare Grundlage bereits definiert. Die Fusion von existierenden Genen zu sogenannten Fusionsgenen führt zu einer individualspezifischen Veränderung der Basensequenz, die sowohl Spezifität im Hinblick auf die zugrunde liegende Erkrankung als auch auf den jeweiligen Patienten besitzt. Im Rahmen dieses Vorgehens wird erfindungsgemäß zunächst mittels molekularer Diagnostik die veränderte genomische Struktur (Bindungsdomäne) als spezifischen Bindungspartner der Gruppierung Z in (I) definiert. Im Gefolge hiervon wird die Gruppierung Z als spezifischer Bindungspartner der Bindungsdomäne synthetisiert und anschließend klinisch eingesetzt. Weiterhin ist auszuführen, dass auch gesunde Zellen definierte Basensequenzen besitzen, die als Bindungsdomäne von Interesse sind. Als Beispiel hierzu mögen embryonale Zellen dienen, die in jedem gesunden Organismus vorhanden sind und als Prototyp einer Zelltyp-spezifischen Genexpression eine gegenüber adulten Zellen geänderte Basensequenz besitzen. Diese Zellen können – ebenso wie maligne Zellen – als Zielobjekte für eine Magnet-Separation intrazellulärer Biomakromoleküle dienen, indem eine spezifische Bindung der Gruppierung Z an intrazelluläre Nukleinsäuren herbeigeführt wird. Somit wird klar, dass die Separation maligner Zellen nur ein Beispiel von vielen sein dürfte. Neben der Separation aus Blut kommt selbstverständlich auch der Einsatz aller anderen Körperflüssigkeiten wie Liquor, Lymphe, Urin, Speichel, Sperma sowie dissoziierter Gewebe in Betracht.

Die erfindungsgemäße Verwendung der magnetischen Nanoteilchen soll am Beispiel der chronisch-myeloischen Leukämie nochmals ausführlicher dargelegt werden. Seit langem ist bekannt, dass der chronisch-myeloischen Leukämie eine spezifische Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 zugrunde liegt, welche als Oberbegriff als Philadelphia-Chromosom bezeichnet werden. Molekulare Analysen der letzten Jahre haben jedoch ergeben, dass selbst bei einer Krankheit eine Vielzahl von möglichen Bruchpunkten – sprich verschiedenen Fusionsgenen – existiert, die beim jeweiligen Patienten individuell definiert werden müssen. Es ist somit nicht möglich, eine Universalstrategie für jeden Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie anzubieten, vielmehr muss im oben beschriebenen Sinne zunächst die exakte Lokalisation des Bruchpunktes (Bindungsdomäne) definiert werden. Die Bruchpunkte sind vorteilhafterweise nach entsprechender Charakterisierung spezifisch mit den erfindungsgemäßen magnetischen Nanoteilchen anzugehen. Es können dann gezielt Zellen des malignen Klons zunächst markiert und später in gewünschter Weise separiert werden. Dieses Vorgehen ist prinzipiell für sämtliche anderen Erkrankungen möglich. Auch solide Tumoren wie das Mammarkarzinom oder das Dickdarmkarzinom werden zunehmend in ihren molekularen Grundlagen verstanden. Hierbei können hereditäre Formen von Brust- und Darmkrebs gegenüber sporadischen Formen, die nach wie vor die weit überwiegende Mehrzahl der Krankheitsfälle ausmachen, abgegrenzt werden. Anhand der Expression bestimmter Genmuster können hier die malignen Zellen wiederum markiert werden und in gewünschter Form isoliert werden. Hierbei ist prinzipiell sowohl die Extraktion aus Flüssigkeiten wie auch aus Gewebe denkbar. An dieser Stelle muss nochmal betont werden, dass ein solch spezifisches Vorgehen bisher mit keinem anderen magnetischen Nanoteilchen realisierbar ist und eine völlig neuartige Anwendung der Bindung von Magnetpartikeln an Biomakromoleküle darstellt.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

0,5 Mol $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ und 1 Mol $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ werden in 100 ml Wasser vollständig gelöst und unter Rühren mit konzentriertem Ammoniumhydroxid versetzt bis ein pH-Wert von 9 erreicht wird. Die schwarzen Teilchen in der Dispersion werden magnetisch abgetrennt und die überstehende Lösung abdekantiert. Danach wird die Dispersion mit halbkonzentrierter HCl auf pH 1–4 gebracht, wobei die Teilchen umgeladen werden. Der Prozeß wird wiederholt bis die Teilchen beginnen zu redispersieren. Danach wird zentrifugiert (5000–10000 g) und die überstehende partikelarme Lösung abdekantiert. Der Rückstand wird wieder in HCl (3–10 N) aufgenommen und der ganze Prozeß solange wiederholt bis eine elektrische Leitfähigkeit von 20–500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bei einem pH-Wert von 4–5 erreicht wird oder aber der Rückstand wird gegen HCl (3–10 N) dialysiert bis ebenfalls diese Werte erreicht werden.

Die Sättigungspolarisation des gebildeten, stabilen Magnetit/Maghemit-Sol beträgt maximal 6 mT.

Beispiel 2

0,5 Mol $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ und 1 Mol $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ werden in 100 ml Wasser vollständig gelöst und unter Rühren mit konzentriertem Ammoniumhydroxid versetzt bis ein pH-Wert von 9 erreicht wird. Die schwarzen Teilchen in der Dispersion werden magnetisch abgetrennt und die überstehende Lösung abdekantiert. Anschließend gibt man unter Rühren einige Milliliter Wasserstoffperoxid (30%ig) zu, wobei die Teilchen zu Maghemit oxidiert werden. Danach werden die Teilchen durch Zugabe von halbkonzentrierter HCl wie unter Beispiel 1 beschrieben behandelt.

Die Sättigungspolarisation des gebildeten, stabilen Maghemit-Sol beträgt maximal 6 mT.

Beispiel 3

Zu 100 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen Magnetit- und/oder Maghemit-Sols gibt man 6 g CM-Dextran (DS 0,4–2) gelöst in 20 ml Wasser und erwärmt die Mischung unter Rühren auf 40–80°C, vorrangig auf 50–60°C, für 30 min. Das dabei gebildete stabile Sol, bestehend aus mit CM-Dextran beschichteten Magnetit/Maghemit-Teilchen, wird anschließend durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Beispiel 4

Zu einer Lösung aus 0,6 g CM-Dextran (DS 0,4–2) in 25 ml Wasser werden unter Rühren bei 70°C 13,1 ml einer 1 M Fe(III)-chlorid-Lösung, in der 2,04 g $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ gelöst sind, langsam zutropft. Danach wird das Reaktionsgemisch durch Zugabe von verdünnter NaOH (2 N) auf pH 9–10 gebracht, anschließend mit verdünnter HCl (2 N) neutralisiert und für 2 h bei 70°C gerührt, wobei der pH-Wert der Lösung durch weitere Zugabe von verdünnter NaOH oder HCl auf einem Wert von etwa 6,5–7,5 gehalten wird. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird der unlösliche Anteil durch Zentrifugation entfernt und die erhaltene magnetische Flüssigkeit durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Die Sättigungspolarisation der CM-Dextran beschichteten Nanoteilchen beträgt maximal 6 mT.

Beispiel 5

Zu 100 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen Magnetit- und/oder Maghemit-Sols gibt man 2 g Dimerkaptobernsteinsäure gelöst in 20 ml Wasser und erwärmt die Mischung unter Rühren auf 70°C für 30 min. Das dabei gebildete stabile Sol, bestehend aus mit Dimerkaptobernsteinsäure beschichteten Magnetit/Maghemit-Teilchen, wird anschließend durch Dialyse gegen Wasser gereinigt. Die Sättigungspolarisation beträgt 1–8 mT, vorrangig 3–6 mT.

Beispiel 6

Zu 100 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen Magnetit- und/oder Maghemit-Sols gibt man 6 g bovines Albumin gelöst in 100 ml Wasser und erwärmt die Mischung unter Rühren auf 70°C, für 30 min. Das dabei gebildete stabile Sol, bestehend aus mit Albumin beschichteten Magnetit/Maghemit-Teilchen, wird anschließend durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Beispiel 7

100 ml der nach Beispiel 1 oder 2 hergestellten Dispersion werden in einer alkalischen Lösung, die 7 g N-Oleoylsarkosin (Korantin SH von BASF) enthält, vermischt und 30 Minuten bei 50–80°C, vorrangig bei 65°C, gerührt. Die Teilchen agglomerieren nach dem Vermischen, stabilisieren sich aber wieder, wenn der pH-Wert im Alkalischen, vorrangig zwischen 8 und 9, gehalten wird. Die Teilchen fallen im Säuren aus, redispersieren aber wieder im Alkalischen.

Beispiel 8

Zu 1 mg Bernsteinsäure gelöst in 10 ml Wasser gibt man unter Rühren die äquimolare Menge eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) und läßt für 30 min bei 5–10°C rühren. Anschließend werden 10 µg eines aminofunktionalisierten Oligonukleotids (5'-H₂N-ACTGGCCGCT-GAAGGGCTTC'TGCC'TC'TCCA-OH-3') gelöst in 50 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0) zugegeben und das Gemisch für 24 h bei 5–10°C gehalten. Zur Abtrennung der Nebenprodukte und nicht umgesetzter Ausgangsstoffe wird gegen Wasser dialysiert und das Reaktionsprodukt lyophilisiert.

Beispiel 9

Zu 10 µg des nach Beispiel 8 funktionalisierten Oligonukleotids, gelöst in 100 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0), gibt man unter Rühren 20 µg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) und hält für 30 min bei 5–10°C. Diese Lösung wird anschließend zu 200 mg Albumin, gelöst in 20 ml Phosphat-Puffer, gegeben und das Gemisch für 24 h bei 5–10°C gehalten. Zur Abtrennung der Nebenprodukte und nicht umgesetzter Ausgangsstoffe wird gegen Wasser dialysiert und das erhaltene Reaktionsprodukt lyophilisiert.

Beispiel 10

1 ml des unter Beispiel 1 und 2 beschriebenen Magnetit- und/oder Maghemit-Sols wird mit Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und durch Zugabe von verdünnter NaOH auf pH 7 eingestellt. Anschließend gibt man 60 mg des nach 9 funktionalisierten Albumins, gelöst in 10 ml Phosphat-Puffer (pH 7,0), zu und erwärmt unter Rühren für etwa 30 min auf 40°C. Die dabei erhaltene magnetische Flüssigkeit wird anschließend zentrifugiert und die Lösung durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Beispiel 11

Zu 10 µg des nach Beispiel 8 funktionalisierten Oligonukleotids, gelöst in 100 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0), gibt man unter Rühren 20 µg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) und hält für 30 min bei 5–10°C. Diese Lösung wird anschließend zu 10 ml der nach Beispiel 6 hergestellten und im Verhältnis 1 : 10 mit Wasser verdünnten magnetischen Flüssigkeit gegeben, für 24 h bei 5–10°C gehalten und danach durch Dialyse gegen Wasser gereinigt.

Beispiel 12

1 ml der nach Beispiel 3 bzw. 4 hergestellten magnetischen Flüssigkeit wird mit Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt, mit 20 mg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) ver-

setzt und für etwa 30 min bei 5–10°C gerührt. Danach werden 10 µg eines Peptids (H-Ala-Ala-Ala-Ala-OH) zugegeben und das Gemisch für 24 h bei 5–10°C gehalten. Zur Abtrennung der Nebenprodukte und nicht umgesetzter Ausgangsstoffe wird gegen Wasser dialysiert.

Beispiel 13

5

Zu 10 ml der nach Beispiel 12 beschriebenen Lösung gibt man 20 µg eines wasserlöslichen Carbodiimids (N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid), läßt für 30 min bei 5–10°C rühren und versetzt mit 10 µg eines aminofunktionalisierten Oligonukleotids (siehe Beispiel 7) gelöst in 50 µl Phosphat-Puffer (pH 7,0). Das Gemisch wird dann für 24 h bei 5–10°C gehalten und anschließend gegen Wasser dialysiert.

10

Patentansprüche

1. Magnetische Nanoteilchen mit biochemischer Wirksamkeit, bestehend aus einem magnetischen Kernteilchen und einer am Kernteilchen fixierten Hüllschicht, **dadurch gekennzeichnet**, daß die magnetischen Nanoteilchen eine Verbindung der allgemeinen Formel

15

M-S-L-Z (I)

enthalten,

20

wobei

die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und L und Z kovalent gebundene funktionelle Gruppen aufweisen und wobei

M das magnetische Kernteilchen,

S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat,

25

L eine Linker-Gruppierung ist und

Z eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist.

ist.

30

2. Magnetische Nanoteilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kernteilchen aus Magnetit, Maghemit, Ferriten der allgemeinen Formel $\text{MeO}_x\text{Fe}_2\text{O}_3$, wobei Me ein zweiwertiges Metall, wie Cobalt, Mangan oder Eisen ist, oder aus Cobalt, Eisen, Nickel, Eisencarbid oder Eisennitrid bestehen.

3. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Kernteilchen 2–100 nm beträgt.

35

4. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das biokompatible Substrat S eine Verbindung wie Poly- bzw. Oligosaccharide oder deren Derivate wie Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Stärke, Dialdehyd-Stärke, Chitin, Alginate, Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose, Proteine oder deren Derivate wie Albumine, Peptide, synthetische Polymere wie Polyethylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin, Polymethacrylate, bifunktionelle Carbonsäuren und deren Derivate wie die Merkaptobornsteinsäure oder Hydroxycarbonsäuren ist.

40

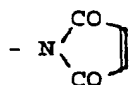
5. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Linker-Gruppierung L durch Umsetzung einer Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, entstanden ist.

45

6. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen Gruppierungen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, -COOR, wobei

50

R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



55

sind.

7. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß S und M kovalent miteinander verbunden sind.

8. Magnetische Nanoteilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen M und S eine elektrostatische Bindung ausgebildet ist.

60

9. Dispersion, bestehend aus magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1 und einer Trägerflüssigkeit.

10. Dispersion nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerflüssigkeit polare und/oder nichtpolare Lösungsmittel enthält.

11. Dispersion nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerflüssigkeit Wasser und/oder ein mit Wasser mischbares Lösungsmittel enthält.

65

12. Dispersion nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß physiologische Zusätze enthalten sind.

13. Biochemisch wirksame Verbindung der allgemeinen Formel

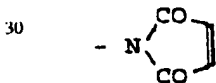
S-L-Z (II).

- 5 wobei
 die Verknüpfungsstellen zwischen S und L und L und Z kovalent verbundene funktionelle Gruppen aufweisen
 und wobei
 S ein an M fixiertes, biokompatibles Substrat,
 L eine biokompatible Linker-Gruppierung und
 10 Z eine Gruppierung, bestehend aus Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen oder deren Derivate, die mindestens eine Struktur aufweist, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist,
 ist.

14. Biochemisch wirksame Verbindung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das biokompatible Substrat S eine Verbindung wie Poly- bzw. Oligosaccharide oder deren Derivate wie Dextran, Carboxymethyl-Dextran, Stärke, Dialdehyd-Stärke, Chitin, Alginate, Zellulose, Carboxymethyl-Zellulose, Proteine oder deren Derivate wie Albumine, Peptide, synthetische Polymere wie Polyethylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenimin, Polymethacrylate, bifunktionelle Carbonsäuren und deren Derivate wie die Merkaptobernsteinsäure oder Hydroxycarbonsäuren ist.

15. Biochemisch wirksame Verbindung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Linker-Gruppierung L durch Umsetzung einer Verbindung wie Dicarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, entstanden ist.

16. Biochemisch wirksame Verbindung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die funktionellen Gruppen Gruppierungen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, -COOR und wobei R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



sind.

17. Verfahren zur Herstellung von magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:

- Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise,
- Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit der Verbindung S-L-Z (II) zur Verbindung M-S-L-Z (I).

18. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:

- Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise,
- Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit dem biokompatiblen Substrat S und
- Umsetzen der entstandenen Verbindung M-S mit einer Verbindung L-Z,

wobei

- 45 zur Herstellung von L-Z eine Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält,

- 50 mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, umgesetzt werden.

19. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte:

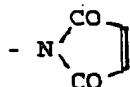
- Herstellung der magnetischen Kernteilchen auf an sich bekannte Weise,
- Umsetzen der magnetischen Kernteilchen mit dem biokompatiblen Substrat S,
- Umsetzen der entstandenen Verbindung M-S mit Verbindungen wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, und
- Umsetzen der entstandenen Verbindung M-S-L mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen S, L und Z über funktionelle Gruppen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, -

COOR und

wobei

R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



5

verknüpft werden.

21. Verfahren zur Herstellung der biochemisch wirksamen Verbindung gemäß Anspruch 13, gekennzeichnet durch die folgenden Verfahrensschritte: 10

a. Herstellung der Verbindung L-Z,

b. Umsetzen von L-Z mit dem biokompatiblen Substrat S,

wobei

zur Herstellung von L-Z eine Verbindung wie Poly- und Dicarbonsäuren, Polyhydroxycarbonsäuren, Diamine, 15
Aminosäuren, Peptide, Proteine, Lipide, Lipoproteine, Glykoproteine, Lektine, Oligosaccharide, Polysaccharide, Oligonukleotide und deren alkylierte Derivate und Nukleinsäuren (DNA, RNA, PNA) und deren alkylierte Derivate, entweder einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegend, die mindestens zwei gleiche oder unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält,

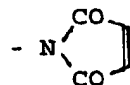
mit Nukleinsäuren, Peptiden und/oder Proteinen bzw. deren Derivate, die mindestens eine funktionelle Gruppe aufweisen und die mindestens eine Struktur enthalten, die spezifisch mit einer Bindungsdomäne eines intrazellulären Biomakromoleküls zur Bindung befähigt ist, 20
umgesetzt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß

die Verbindungen S, L und Z über funktionelle Gruppen wie -CHO, -COOH, -NH₂, -SH, -NCS, -NCO, -OH, - 25
COOR und

wobei

R Alkyl-, Acyl- oder Aryl-Reste sind und



30

verknüpft werden.

23. Verwendung der magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1 zur Separation von Zellen. 35

24. Verwendung der magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1 zur Separation von malignen Zellen.

25. Verwendung der magnetischen Nanoteilchen gemäß Anspruch 1 zur Separation von intrazellulären Biomakromolekülen. 40

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -